Thesis Title Hemolytic Activities and Cooperative (CAMP-like) Hemolytic Reactions Triggered by Airborne *Aspergillus* or *Penicillium*

Author Miss. Sumonrat Kaveemongkonrat

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Advisory Committee Prof. Dr. Nongnuch Vanittanakom Advisor

Dr. Kwanjit Duangsonk Co-advisor

ABSTRACT

Aspergillus and *Penicillium* species are important mold in the indoor environment. Human exposes to indoor mold mainly via inhalation. The toxic effects and irritations probably results from a chronic or high exposure to fungal fragments and metabolites. Pulmonary mycotoxicosis through mold inhalation was initiated because of a local cluster of cases of acute pulmonary hemorrhage in infants living in water-damaged homes. Some indoor molds were able to produce hemolysins that could create pores in red blood cell membrane resulting in release of the iron for their growth. Cooperative (CAMP-like) hemolytic reaction between mold and bacteria may be one of potential relevancies to lyse red blood cells. In this study, the hemolytic activities and CAMP-like reactions of airborne *Aspergillus* and *Penicillium* were investigated.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Indoor molds from public rooms at Faculty of Medicine, Chiang Mai University were quantified, and identified by morphologies and/or nucleotide sequences. Their hemolytic activities were tested on complete solid media supplemented with human or sheep erythrocytes and demonstrated as hemolytic index. Total indoor molds were found ranging from 800 CFU/m^3 to 980 CFU/m^3 in average of 895.67±90.53 CFU/m^3. Most of molds such as *Acremonium, Curvularia, Fusarium, Trichoderma,* particularly *Aspergillus, Penicillium,* and *Cladosporium* could lyse human erythrocytes. *Aspergillus* and *Penicillium* were found averagely 87.67±63.96 CFU/m^3 and 38.67±38.02 CFU/m^3, respectively. One half of *Aspergillus* and one-fifth of *Penicillium* isolates could lyse human erythrocytes with hemolytic indices ranging from 1.00 to 1.85 and 1.24 to 2.67, respectively. These molds which had hemolytic activity included *A. wentii, A. westerdijkiae, A. flavipes, P. citrinum, P. decumbens* and *P. sumatrense.* Most isolates could not produce hemolytic zones at 25ºC but some could do so well when they were spore germinated initially at 25ºC and grown continuously at 37ºC. They could lyse human red blood better than sheep blood. However, all species of both genera produced hemolytic zones in high variation.

To determine whether the release of hemolytic factors might depend on the environmental conditions, the hemolytic activities during growth in different medium compositions, temperatures and the presence of red blood cell were observed in *A. wentii* B1 and *P. decumbens*. During growth in liquid medium, *A. wentii* B1 could survive at 37ºC after initially spore germination at 25ºC, however hemolytic factors were released in high level when growing exponential only at 25ºC. Hemolytic factors

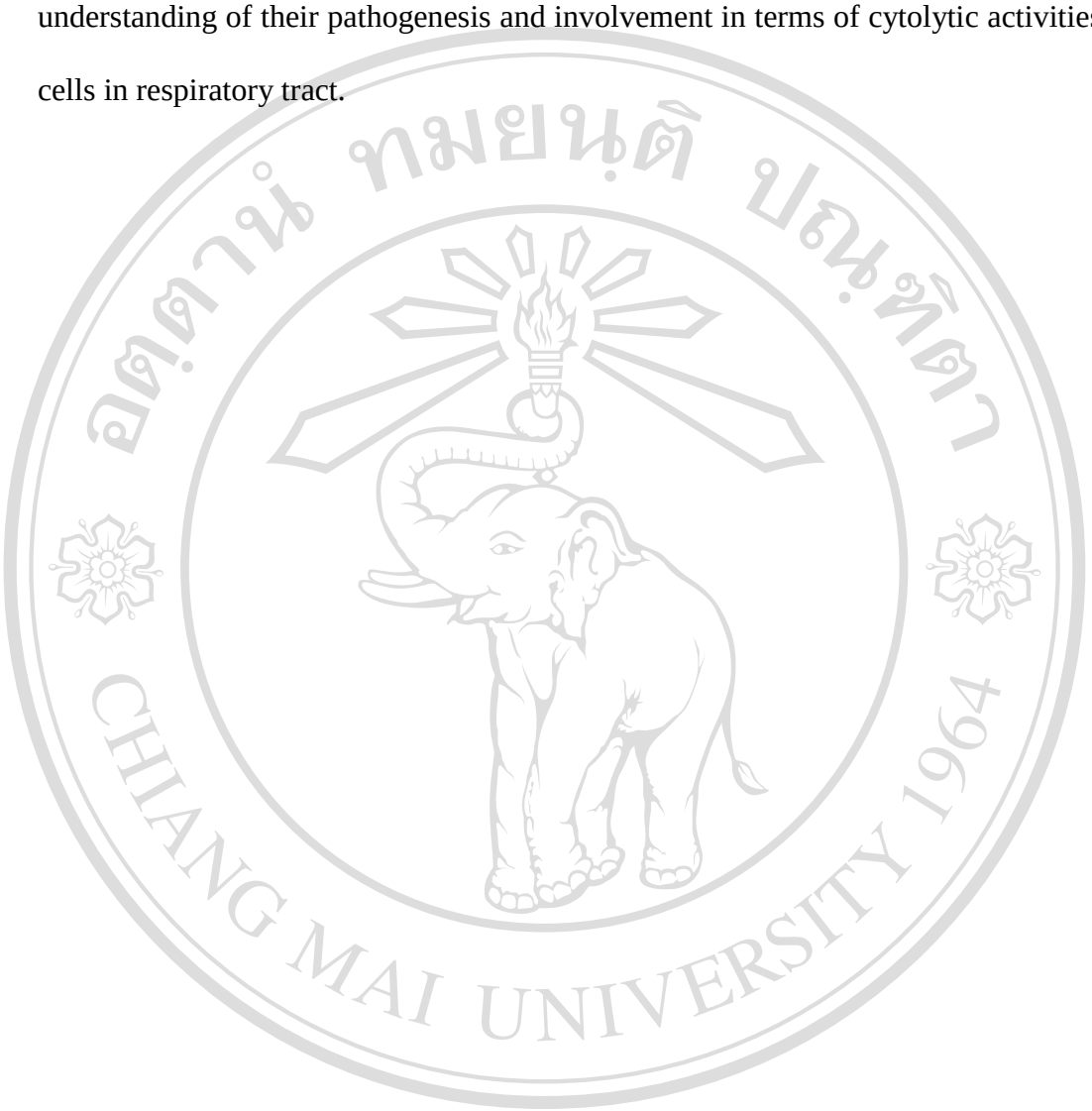
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

of this mold were secreted during growth in undernourished medium better than complete medium and were heat labile at 100ºC. Secreted proteins eluted from native gel cut which could lyse sheep erythrocytes had molecular mass over 50 kDa. *P. decumbens* released low level of hemolytic factors at the late exponential growth only in undernourished medium. Its hemolytic factors were heat stable at 100ºC. Additionally, in undernourished medium, the presence of small amount of the red blood cells slightly induced the lysis of sheep red cells triggered by *A. wentii* B1.

Cooperative interaction between *Aspergillus* or *Penicillium* and *Staphylococcus aureus* was shown synergistically as half-moon-shaped complete hemolysis in the α-hemolytic zone of bacteria. For synergistic hemolytic zone between mold and *Streptococcus pneumoniae,* it was shown as half moon-shaped clear zone underneath the bacterial colony. With sheep erythrocytes, CAMP-like reactions were identified in most of the isolates of *A. flavipes*, *A. westerdijkiae*, *P. citrinum, P. decumbens* and *P. sumatrense* with *Staphylococcus aureus* but the results were varied when tested with *Streptococcus pneumoniae*. No reaction could be detected using *Staphylococcus epidermidis* and *Streptococcus pyogenes*. No reaction could be detected in all species tested with human erythrocytes. Interestingly, most of *Aspergillus* and *Penicillium*, which had no hemolytic activities, showed synergistic hemolytic reactions with *Staphylococcus aureus*. The synergistic activities between mold and *Staphylococcus aureus* could occur via the interaction of sphingomyelinase from *Staphylococcus aureus* and CAMP-like factors from indoor mold, such as *A. flavipes* or *P. sumatrense*. Further efforts on purification and characterization of the hemolytic and CAMP-like factors released from those molds may lead to more

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

understanding of their pathogenesis and involvement in terms of cytolytic activities to cells in respiratory tract.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงและการเกิดปฏิกิริยาร่วมสลายเม็ดเลือดแดง (CAMP-like) ที่เกิดจากราแอสเปอร์จิลลัสหรือเพนนิซิเลี่ยมในอากาศ
ผู้เขียน	นางสาวสุมลรัตน์ กวีมงคลรัตน์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ.ดร. นงนุช วณิตย์ธนาคม อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อ.ดร. ขวัญจิต ดวงสงค์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

Aspergillus และ *Penicillium* เป็นราที่พบมากในสิ่งแวดล้อมในอาคาร มนุษย์สามารถสัมผัสราเหล่านี้ได้ทางการหายใจ การเป็นพิษและระคายเคือง อาจเป็นผลจากการสัมผัสกับราหรือสารที่สร้างจากราเป็นเวลานานหรือปริมาณมาก ผลจากการสูดดมราอาจเป็นสาเหตุให้เกิด pulmonary mycotoxicosis ได้ เริ่มต้นจากมีการศึกษาการระบาดในเด็กที่อาศัยในบ้านที่เก่าและชื้นที่มีอาการ acute pulmonary hemorrhage ซึ่งราบางชนิดสามารถสร้างฮีโมลัยซินที่มีฤทธิ์ทำให้เกิดรูที่ผนังของเม็ดเลือดแดงได้ในการนำเหล็กมาใช้ในการเจริญ นอกจากนี้ปฏิกิริยาร่วมระหว่างรากับแบคทีเรียอาจเป็นทางหนึ่งที่ทำให้เชื้อสลายเม็ดเลือดแดงได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาฤทธิ์การสลายเม็ดเลือดแดงและปฏิกิริยาร่วมในการสลายเม็ดเลือดแดงของรา *Aspergillus* และ *Penicillium*

ทำการแยกราจากห้องที่ใช้ร่วมกันในคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นับและจัดจำแนกราโดยศึกษาลักษณะรูปร่าง และ/หรือศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และศึกษาฤทธิ์การสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารวุ้นที่ผสมเม็ดเลือดคนหรือแกะ โดยแสดงเป็นค่า hemolytic index จากการศึกษาพบจำนวนราทั้งหมดในอาคารอยู่ในช่วง 800 CFU/m^3 ถึง 980 CFU/m^3 มีค่าเฉลี่ย 895.67±90.53 CFU/m^3 ราเหล่านี้ได้แก่ *Acremonium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Trichoderma* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Cladosporium* สามารถสลายเม็ดเลือดแดงคนได้ รา *Aspergillus* และ *Penicillium* พบมีปริมาณเฉลี่ย 87.67±63.96 CFU/m^3 และ 38.67±38.02

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

CFU/m^3 ตามลำดับ พบว่าจำนวนครึ่งหนึ่งของ *Aspergillus* และหนึ่งในห้าของ *Penicillium* มีฤทธิ์สลายเม็ดเลือดของคนได้ โดยมีค่า hemolytic index อยู่ในช่วง 1.00 ถึง 1.85 และ 1.24 ถึง 2.67 ตามลำดับ ราเหล่านี้ได้แก่ *A. wentii*, *A. westerdijkiae*, *A. flavipes*, *P. citrinum*, *P. decumbens* และ *P. sumatrense* ส่วนมากราเหล่านี้ไม่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงที่ 25ºC แต่บางไอโซเลทสามารถสลายเม็ดเลือดแดงได้เมื่อให้สปอร์งอกก่อนที่ 25ºC และนำไปเจริญต่อที่ 37ºC โดยทั้งหมดสามารถสลายเม็ดเลือดแดงของคนได้ดีกว่าของแกะ อย่างไรก็ตามทุกสปีชีส์ในทั้งสองจีนัสนี้มีการสร้างขนาดวงการสลายเม็ดเลือดแดงที่แปรปรวนมาก

การศึกษาเพื่อให้ทราบว่าการสร้าง hemolytic factor นั้นขึ้นอยู่กับภาวะสิ่งแวดล้อมหรือไม่ โดยทำการศึกษาฤทธิ์การสลายเม็ดเลือดแดงระหว่างการเจริญของเชื้อ *A. wentii* B1 และ *P. decumbens* ในอาหารต่างชนิด ที่อุณหภูมิต่างกัน และการมีเม็ดเลือดแดงอยู่ในขณะที่เชื้อเจริญ ผลการศึกษาพบว่าในอาหารเหลว *A. wentii* B1 มีการอยู่รอดได้เพียงเล็กน้อยที่ 37ºC หลังจากให้สปอร์งอกที่ 25ºC อย่างไรก็ตามมีการสร้าง hemolytic factor ระดับสูงเมื่อเชื้อเจริญที่ 25ºC Hemolytic factors ของรานี้มีการสร้างในระหว่างที่เชื้อราเจริญในภาวะขาดแคลนอาหารได้ดีกว่าภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์ และสามารถถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่ 100ºC โดยพบโปรตีนที่สกัดจาก native gel จากบริเวณที่สามารถสลายเม็ดเลือดแดงแกะได้มีขนาดมวลโมเลกุลมากกว่า 50 kDa ส่วน *P. decumbens* มีการสร้าง hemolytic factor ในระดับต่ำที่ระยะท้ายของการเจริญที่ 25ºC เพียงในภาวะขาดแคลนอาหารเท่านั้น ซึ่ง hemolytic factor นี้สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100ºC นอกจากนี้ในภาวะขาดแคลนอาหารการมีอยู่ของเม็ดเลือดแดงเพียงเล็กน้อยสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสลายเม็ดเลือดแดงมากขึ้นได้ในเชื้อ *A. wentii* B1

ปฏิกิริยาร่วมของเชื้อ *Aspergillus* หรือ *Penicillium* เมื่อเจริญใกล้กับเชื้อ *Staphylococcus aureus* ทำให้เกิดเสริมฤทธิ์การสลายเม็ดเลือดแดงแกะแบบสมบูรณ์เป็นรูปคล้ายเสี้ยวพระจันทร์ภายในบริเวณการสลายเม็ดเลือดแบบไม่สมบูรณ์ของแบคทีเรีย ส่วนปฏิกิริยาร่วมกับเชื้อ *Streptococcus pneumoniae* พบเกิดเสริมฤทธิ์การสลายเม็ดเลือดแดงใต้โคโลนีของแบคทีเรีย โดย *A. flavipes*, *A. westerdijkiae*, *P. citrinum*, *P. decumbens* และ *P. sumatrense* แสดงปฏิกิริยาร่วมสลายเม็ดเลือดแดงกับ *Staphylococcus aureus* แต่พบผลไม่คงที่เมื่อทดสอบกับ *Streptococcus pneumoniae* บนเม็ดเลือดแดงแกะ และไม่พบปฏิกิริยาร่วมดังกล่าวเมื่อทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus epidermidis* และ *Streptococcus pyogenes* และในการทดสอบด้วยเม็ดเลือดแดงของคน ยังพบสิ่งที่น่าสนใจในรา *Aspergillus* และ *Penicillium* ที่ไม่พบมีฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปรากฏผลการเสริมฤทธิ์สลายเม็ดเลือดแดงกับ *Staphylococcus aureus* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าปฏิกิริยาการเสริมฤทธิ์ระหว่างราและ *Staphylococcus aureus* นี้เกิดได้จาก sphingomyelinase ที่สร้างจาก *Staphylococcus aureus* และมี CAMP-like factor จากราภายในอาคารเข้าร่วมเสริมฤทธิ์ราเหล่านี้ เช่น *A. flavipes* หรือ *P. sumatrense* การศึกษาต่อไปในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์และ/หรือมีฤทธิ์เสริมการสลายเม็ดเลือดแดงจากราเหล่านี้ จะนำไปสู่ความเข้าใจถึงกลไกการก่อโรคและฤทธิ์การสลายเซลล์ในระบบทางเดินหายใจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved